

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑫ 公開特許公報(A) 昭62-247247

⑮ Int. Cl.

G 01 N 33/48
B 01 D 57/02
G 01 N 27/26
33/53

識別記号

庁内整理番号

A-8305-2G

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月28日

A-6923-2G

T-7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 マルチエレクトロブロットイング方法

⑯ 特 願 昭61-91067

⑰ 出 願 昭61(1986)4月19日

⑱ 発 明 者 長 尾 憲 樹 小平市上水本町1568番地
⑱ 発 明 者 嬰 栗 一 雄 高石市羽衣3丁目4番16号
⑱ 発 明 者 川 北 幸 男 栃木県河内郡河内町立伏75番81号
⑲ 出 願 人 東洋濾紙株式会社 東京都中央区日本橋本町3丁目7番地
⑲ 出 願 人 東洋科学産業株式会社 大阪市東区船越町2丁目36番地
⑳ 代 理 人 弁理士 大関 和 夫

明 細 書

1. 発明の名称

マルチエレクトロブロットイング方法

2. 特許請求の範囲

表裏両側に開口する少なくとも1個の開口部及び上部電極を有しかつ上側に電解液保持枠を備えたトッププレートと、該トッププレートの下方に位置して前記開口部を覆う微孔膜と、該微孔膜の下方に位置して前記トッププレートの開口部と連通するごとく対応した位置に開口部を有するセンタープレートと、該センタープレートの下方に位置して電解液溜用の凹部及び下部電極を備えたボトムプレートとからなり、且つ電解液を充填したフィルター装置を用い、前記トッププレートの開口部と前記微孔膜とによって形成されたウエル内に、1種若しくは2種以上の液体試料を順次添加し、上部及び下部電極を介しての通電下に、電気泳動的に前記試料を前記ウエル内の微孔膜に吸着させ、かくして生成した固定物の濃度を比較または測定することを特徴とするマルチエレクトロブ

ロットイング方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は実験室等で行われる生化学的テスト及びブスクリーニング並びに生化学反応を行う場合に有用なマルチブロットイング方法に関するものである。

(従来の技術及び問題点)

生化学研究では「組み換えスクリーニング」「ハイブリッドスクリーニング」及び「各種イムノアッセイ」等を目的として試料中の微量物質を検出、測定するため固相法の一つであるマイクロプレート法が数多く利用され、そのための装置も種々考案されている。特に微孔膜をウエル底部に配置して実施する方式のものは、このウエルに試料を置き、膜下部を減圧にして液体を強制的に微孔膜を通して下方に通過させることによって目的物質を該微孔膜に濾過吸着させるが、この方法は試料に対する微孔膜の接触面積が大きいこと、濾過のみで残液を除ける等の長所がある。

しかし、この方法には、尚、下記の様な欠点が認められる。

- ① 微孔膜に対する固定化、及び微孔膜に吸着した物質と液相中の成分を反応させるのに概々1時間以上の長時間を要する。
- ② 濾過時にどうしてもウエルによる壁面効果が出るため、スポット周辺が濃く、中央部が淡くなる「壁面効果」が現われてスポットが不均一になり、透過光や反射光等による濃度測定が不正確になり易い。
- ③ 隣接しているウエルへの「わき流れ」が生じやすい。

例えば特開昭60-43377号公報はこの「わき流れ」を改善するため、下段プレートの開口部が偏平突起内にある様にしているが、実際にテストしてみた所、「わき流れ」防止は尚、完全ではない。しかもスポットが不均一である点および反応に長時間を要する点は何等改善されていない。これに対して特開昭60-100054号公報、特開昭59-76513号公報、特開昭59

-153172号公報では上段プレート開口部下部に微孔膜を接着固着させてあるため、「わき流れ」の防止は略々完全に出来るが、プレートと微孔膜が固着されているため、濃度測定時等に面倒なばかりか、一回毎に膜と共に上部プレートも使い捨てになるため経済的でない。

しかも、これらの特許文献に示されているものは何れも「スポット濃度が不均一である」、「反応時間が長くなる」等については何等改善されていない。

(問題点を解決するための手段)

これらの従来技法及び装置を改善するために、本発明者らは鋭意研究した結果、従来のマルチ濾過技術に電気泳動法を適用することによってこれらの欠点を完全に克服しうることを見出した。

本発明の方法によれば前述の諸欠点を克服し、微量物質の測定に際しての正確さと共に迅速さを与えることが可能である。

従来のマルチ濾過装置に電気泳動法を適用することによって荷電性物質を電気的に微孔膜に吸着

し、又微孔膜に吸着した物質と液相中の成分の反応を電気的に行い、反応を短時間に完了せしめることが可能である。

本発明は、ゲル中の物質を電気的に微孔膜に転移させたり、微孔膜に平行に電圧をかけて、微孔膜中の物質を移動させるのではなく、直接に微孔膜が陰極及び陽極側の電解液と接触し、且つこの微孔膜に対し垂直方向に物質が移動する点に一つの特徴がある。このため、反応は、数分～十数分という極めて短時間で終了する。

即ち、本発明は、表裏両側に開口する少なくとも1個の開口部及び上部電極を有しかつ上側に電解液保持枠を備えたトッププレートと、該トッププレートの下方に位置して前記開口部を覆う微孔膜と、該微孔膜の下方に位置して前記トッププレートの開口部と連通するごとく対応した位置に開口部を有するセンタープレートと、該センタープレートの下方に位置して電解液溜用の凹部及び下部電極を備えたボトムプレートとからなり、且つ電解液充填したフィルター装置を用い、前記トッ

ププレートの開口部と前記微孔膜とによって形成されたウエル内に、1種若しくは2種以上の液体試料を順次添加し、上部及び下部電極を介しての通電下に、電気泳動的に前記試料を前記ウエル内の微孔膜に吸着させ、かくして生成した固定物の濃度を比較または測定することを特徴とするマルチエレクトロブロットティング方法を要旨とするものである。

本発明を実施する装置は次の様な構成よりなっている(第1図および第2図参照)。

頂面及び底面を有しかつ両面部に開放する少くとも一つ以上の開口部6を具備するトッププレート1を有する。

このトッププレートのサイズは生化学でよく使われる96穴プラスチック製マイクロプレートの寸法が好ましく、開口部の数、サイズ、及び開口部同士の間隔等もこれと一致することが好ましい。この開口部間隔又はこれと同様の開口部配列を採用すれば、本発明の実施装置を現在市販の自動走査濃度計等と併用することが可能である。

代表的な開口部配列としては、8行×12列の長方形配列で96ヶの円形開口部を設け、開口部同士の中心間隔を約9mmとする。また、開口部の大きさは直径2～6mm程度で通常は3～4mmである。それぞれが相互に連っている開口を有する「だ円形」又は「スリット形」の開口部を作ること勿論可能である。

このトッププレート1の厚さは10mm～50mm程度とするのが好ましい。又その頂面上部に電解液保持槽7が連設され、その内部に電極8が張設される。電極8の張り方はトッププレート1の各開口部に均一に電流が流れる様に配慮すべきである。例えば液保持部の内側四周にリング状に配列してもよいし、全体に膜状に張ってもよい。更に上部の蓋に各開口部毎に針状に配線することも可能である。特にリング状に配列することが均一な電流をもたらす上で好ましい。

試料の添加される開口部の容積は300μℓ～600μℓ程度が通常であるが、場合によっては開口部の容積を1ℓ程度にすると、本法の1つ

の特徴である稀薄試料の測定に便利である。又その断面形状はストレート型又は底部が小さくなるロート型が好ましい。

トッププレート1の下方には微孔膜2が配置される。微孔膜としてはニトロセルロース、ナイロン、セルロースアセテート、ポリテトラフルオロエチレン、ふっ化ビニリデンその他があるがニトロセルロース、ナイロン、等の蛋白吸着性のある膜が特に好ましい。孔径は3μ～0.2μ程度が一般である。場合によってはセルロース系、或はガラス繊維系の濾紙が使われることもある。微孔膜2の大きさはトッププレート1の底面開口部全体を覆うのに十分な広さを有するものが用いられる。

この微孔膜2の下方にはガスケット3（後述）を介して微孔膜を支え、且つトッププレート1の開口部6の数に対応する開口部11を有するセンタープレート4が配設される。このセンタープレート4は微孔膜2を支え且つ各開口部を独立させるだけの能力のある厚さ及び構造が必要である。

又、電解液充填時、センタープレート4の開口部11内に空気が滞留するのを防ぐため、その構造は第3図に示す様に微孔膜に接する方を小さく、反対側を大きくするのが好ましい。

センタープレート4の下側には該センタープレートの開口部11を被覆するに十分な広さを有すると共にセンタープレート4の下方を外部と遮断できる凹部10を有するボトムプレート5が配設される。ボトムプレート5の凹部10内には電源に接続された下部電極9が張設されている。電極9の配列はトッププレート1の場合と同様に各開口部11に均一に電流がかかる様な形にする。例えばボトムプレート5の凹部四周にリング状に配線してもよく、又、開口11に個別に配線してもよい。

ボトムプレート5には真空ポンプに連結される排出用バルブ付きの給排出管12及びプレート内に電解液を注入する場合の空気抜き管13が設けられている。

各プレート間のシールを完全にするため、セン

タープレート4とボトムプレート5の間にはリング14又は平パッキンが設けられており、又、トッププレート1とセンタープレート4の間には微孔膜を挟んでシリコン等からなるガスケット3が挿入され、このガスケット3にはセンタープレート4の頂部開口11と整合する互いに不連続な孔行列が設けられている。

ガスケット3の厚さは十分なクッション効果があり、且つシールの完全なものを使用する（厚さ2mm～6mm程度が好ましい。）。

本装置の組み立て時の締め付けは「ねじ締め」又は「ばね締め」で行なわれるが、必要によって開口部を各プレート毎に整列させ、各部が正しく組立てられるためのガイドが設けられる。場合によっては装置全体を恒温状態に保つ手段を付加する。電源は安定直流電源が通常であるが、パルス電圧による直流電流を使用することもできる。

更に第1図および第2図に示す装置による実際の操作法を次に述べる。

先づ微孔膜2を電解液に浸漬して完全に潤滑さ

せたものをセンタープレート4上に敷いたガasket 3の上に該ガasketの開口部を完全に被覆する如く置き、次いでその上側にトッププレート1、下側にボトムプレート5を積層して第1図、第2図に示す如く組立てる。ボトムプレート5の給排出管12をやや上に傾斜させてバルブを開き電解液をボトムプレート5内に徐々に注入する。ボトムプレート5内の残留空気は空気抜き管13から完全に抜き、ボトムプレート内を電解液で充填させ、次いで空気抜き管13、及び給排出管12を閉塞する。次いでトッププレート1上の電解液保持槽7に電解液を注入する。

トッププレート1の開口部6(試料保持孔)に、蔗糖等の不活性添加剤を加えて電解液より比重を増加させた蛋白試料液 $50\mu\text{L} \sim 1000\mu\text{L}$ の一定量を加える。試料液は第2図の様に微孔膜2上に滞留する。

電極8、9に一定時間直流電圧をかけて試料液中の蛋白成分を電気泳動させ微孔膜2に吸着させる。その後、吸引濾過又は吸上げ法で電解液及

び試料残液を装置から除く。

次に装置を解体して微孔膜2を取り出し、アミドブラック等で染色し、洗滌、乾燥後、デカリン等で透明化处理し、透過光法で蛋白濃度を測定する。

又、本装置を使用し、微孔膜上でイムノアッセイを行う場合は、抗原又は抗体液を開口部6に注入して、前記と同様に処理し、次いでブロック剤検液、酵素標識抗体、発色用基質等を順次に前記と同様に添加し処理し、乾燥後場合によっては透明化处理して濃度測定する。

以下、実施例によって本発明を更に詳細に説明する。

(実施例)

第1図、第2図に示す装置を用いて下記条件で蛋白濃度測定を行った。

- ① 試料として純水 $50\mu\text{L}$ 中に $1.0\mu\text{g}$ のアルブミンを溶解したものを96ウエルの各々に添加(但し、蔗糖を添加して電解液より比重を大きくした)。

- ② 電解液としてトリス、グリシン液(pH8.2)をトッププレート及びボトムプレート、センタープレート内に充填。

- ③ 使用多孔膜：東洋濾紙製ニトロセルロースメンブランフィルター($0.45\mu\text{m}$ 孔径)

- ④ 電気泳動条件：48V、40mA(定電流)、時間6分間。

電気泳動終了後、電解液及び試料残液を吸引除去し、微孔膜を装置より取り外して金コロイド液アウロガイ(商標)(製造ヤッセン(ベルギー)、販売、和光純薬(日本))で染色、水洗、乾燥後、透過光でスポット部の濃度測定を行った。その結果を第4図に示す。

(比較例)

実施例と同一の装置を用い、同一試料(但し、蔗糖は無添加)の同一量を開口部に添加し電気泳動によらずにそのまま6分間静置後、吸引濾過し、同様の処理をしてスポットの濃度測定を行った。結果は第4図に示すとおりである。

すなわち、第4図に示す如く、本発明の実施例

の場合は、スポットの濃度は均一であり、かつ96ウエルの測定値の標準偏差は1.635と僅少であったのに対して、比較例の場合のスポットは中心が淡色で周囲が濃色という不均一な濃度を示しかつ標準偏差は8.40と著しく高い値となり、測定値は著しいバラツキを示した。

(発明の効果)

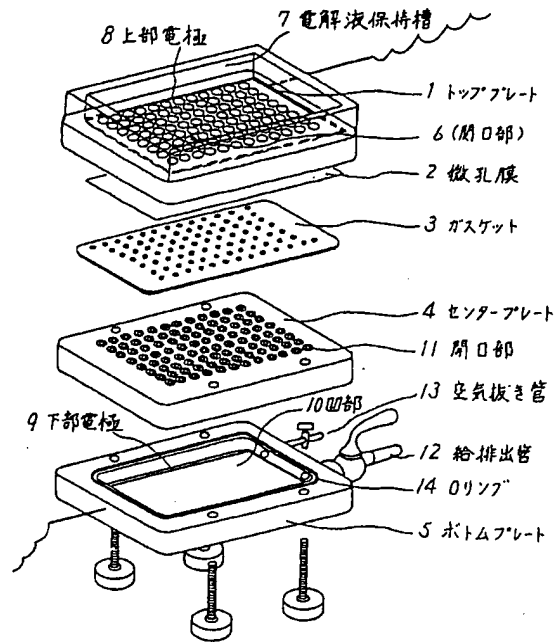
以上の如く、本発明によれば実験室等で行われる各種生化学的テスト及びスクリーニング並びに生化学反応等に際して微量試料で正確、迅速に実施可能である。従って本発明は例えば生物学的又は生化学的試験、研究に裨益するところが極めて大である。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明を実施する装置の構成の一例を示す斜視図、第2図は同上概略断面図、第3図はセンタープレートの開口部の形状例を示す図、第4図は本発明例及び比較例による蛋白濃度測定試験結果を示す図である。

1：トッププレート、2：微孔膜、3：ガス

第 1 図

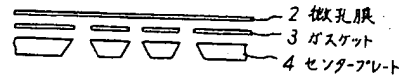


ケット、4: センタープレート、5: ボトム
プレート、6: 開口部、7: 電解液保持槽、
8: 上部電極、9: 下部電極、10: 凹部、
11: 開口部、12: 給排出管、13: 空気
抜き管、14: Oリング。

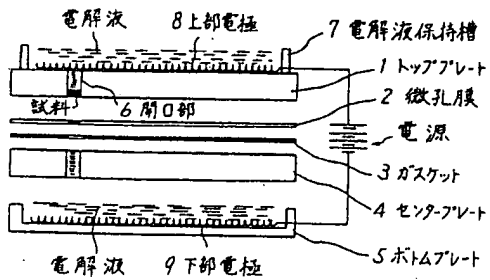
特許出願人 東洋濾紙株式会社他1名
代理人 大関和夫



第 3 図



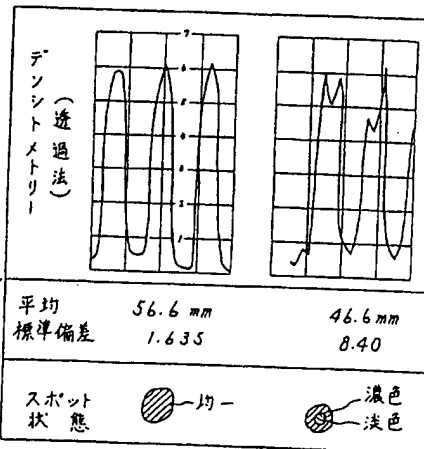
第 2 図



第 4 図

(実施例)

(比較例)



WEST

Generate Collection

L11: Entry 1 of 1

File: DWPI

Oct 28, 1987

DERWENT-ACC-NO: 1987-344377

DERWENT-WEEK: 199614

COPYRIGHT 2002 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Multi-electro-plotting filter device - comprising top plate, upper electrode, tank for electrolyte soln. and porous membrane below top plate allowing rapid analysis

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

TOYO KAGAKU SANGYO KK

TOYO ROSHI KKANGYO KK

CODE

TOKAN

TORON

PRIORITY-DATA: 1986JP-0091067 (April 19, 1986)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 62247247 A	October 28, 1987		005	
JP 96023547 B2	March 6, 1996		005	G01N027/447

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	DESCRIPTOR
JP62247247A	April 19, 1986	1986JP-0091067	
JP96023547B2	April 19, 1986	1986JP-0091067	
JP96023547B2		JP62247247	Based on

INT-CL (IPC): B01D 57/02; G01N 27/26; G01N 27/447; G01N 33/48; G01N 33/483; G01N 33/53; G01N 33/561

ABSTRACTED-PUB-NO: JP62247247A

BASIC-ABSTRACT:

In multi-electroplotting, a filter device comprises a top plate which has holes opening on both sides and an upper electrode, having a tank for holding an electrolyte soln. formed on the top; a porous membrane (nitrocellulose, nylon, etc. having pores of 3 to 0.2 microns) provided below the top plate to cover the holes; and a bottom plate which is arranged below the centre plate and has holes at places corresp. to the holes of the top plate so as to communicate with them, having a lower electrode and a recess to put an electrolytic soln.. One or more types of liq. samples are supplied sequentially into the wells formed by the holes of top plate and the porous membrane, and, applying voltage between the upper and the lower electrodes, the samples are absorbed electrophoretically in the porous membrane in the wells; and the concn. of the fixed material thus produced is compared or determined.

USE/ADVANTAGE - In the biochemical researches, the microplate method, a solid phase method, is used to detect and determine trace materials included in samples. Partic. the method in which, a porous membrane is placed on the bottom of a well, and the objective substance is absorbed in the porous membrane by passing the soln. forcibly through the porous membrane, has many advantages. However, the conventional methods has shortcomings such as a long time for absorption in membrane, uneven concn. due to "wall surface effect", etc.. In this method, rapid and correct analysis becomes possible.

CHOSEN-DRAWING: Dwg. 0/0